

THESIS

MUNICH

1985

Experimentelle Untersuchungen zur Diagnose des Phäochromocytoms

Konrad Falke

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik
der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. E. Werle

Experimentelle Untersuchungen zur Diagnose

des Phäochromocytoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Konrad Falke
aus Chemnitz

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. E. Werle

Dekan: Professor Dr. O. Hug

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1964

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) Einführung	1
B) Problemstellung	3
C) Methodik	5
I. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler und nikotinbehandelter Ratten mit tritiummarkiertem Lobelin	5
1. Aktivitätsbestimmung des tritierten Lobelin in wäßriger Lösung	6
2. Reinheitsbestimmung des aktiven Lobelin durch Aufnahme des Absorptionsspektrums im UV-Licht im Vergleich zu nichtmarkiertem Lobelin	7
3. Untersuchung der Aktivitätsverteilung im Rattenorganismus nach intravenöser Injektion von tritiiertem Lobelin	7
4. Dünnschichtchromatographie der Gewebsextrakte von mit H^3 -Lobelin behandelten Ratten	8
5. Bestimmung der Aktivität und des Lobelingehaltes des Nebennierenmarkes	9
II. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler (und nikotinbehandelter) Ratten mit C^{14} -DOPA	10
III. Nikotinbehandlung von Ratten zur Erzeugung einer funktionellen Hyperplasie des Nebennierenmarkes	10
1. Bestimmung der Catecholamine im 24-Stundenharn	11
2. Bestimmung der Catecholamine im Harn nach Reserpininjektion	11
3. Bestimmung des Catecholamingehaltes der Nebennieren	12

D) Ergebnisse	13
I. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler und nikotinbehandelter Ratten mit tritiiertem Lobelin	13
1. Bestimmung der spezifischen Aktivität des tritiierten Lobelin	13
2. Photometrische Reinheitsbestimmung des tritiierten Lobelin	14
3. Aktivitätsverteilung im Rattenorganismus nach intravenöser Injektion von tritiiertem Lobelin	14
4. Dünnschichtchromatographie von Gewebsextrakten	16
5. Bestimmung von Aktivität und Lobelingehalt des Nebennierenmarkes	20
II. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler Ratten mit C ¹⁴ -DOPA	21
III. Nikotinbehandlung von Ratten zur Erzeugung einer funktionellen Hyperplasie des Nebennierenmarkes	23
1. Bestimmung des Catecholamingehaltes im 24-Stundenharn	23
2. Bestimmung des Catecholamingehaltes des 24-Stundenurins nach Reserpininjektion	24
3. Bestimmung des Catecholamingehaltes in den Nebennieren	24
E) Diskussion	26
I. Zur Methodik	26
II. Lobelin	27
III. DOPA	28
F) Zusammenfassung	30
Literaturverzeichnis	32
Lebenslauf	36

A) Einführung

Bei Hochdruck unklarer Genese wird heute sehr viel häufiger als früher die Möglichkeit des Vorliegens eines Phäochromocytoms (Ph) in Betracht gezogen. Die Tumorzellen des Ph stammen aus den Sympathicoblasten, den Mutterzellen der Ganglienzellen des Sympathicus, und dementsprechend ist das Ph als "Tumor des chromaffinen Gewebes" definiert. Obwohl das Ph nur in etwa 7,5% der Fälle den Charakter einer malignen Entartung trägt, erlangt es durch seine innersekretorische Leistung klinische Bedeutung (1). Die Tumorzellen produzieren, wie die Mutterzellen des Nebennierenmarkes, die Gewebshormone Adrenalin und Noradrenalin, welche durch ihre pharmakodynamischen Eigenschaften trotz Benignität des Tumors zu sekundären Schädigungen und dadurch zum Tod des Trägers führen können. Es bestehen zwar Unterschiede in der pharmakologischen Wirkung von Noradrenalin und Adrenalin, doch steht für die Klinik des Ph der blutdrucksteigernde Effekt im Vordergrund. Diese Gefäßwirkung führt zum charakteristischen Merkmal, der paroxysmalen Hypertension.

Anhand der Bestimmung der Ausscheidung von Noradrenalin, Adrenalin und ihrem Metaboliten, der 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im 24-Stundenurin kann das Vorliegen eines Ph mit großer Sicherheit erkannt oder ausgeschlossen werden. Etwa 80% aller Ph befinden sich in den Nebennieren oder in deren unmittelbaren Umgebung. Die restlichen 20% werden vom sympathischen Gewebe anderer Gebiete ausgehend, in der Nachbarschaft der Aorta, im Mediastinum, im Zuckerkandl'schen Organ, in der Harnblase (intramurales System) etc. angetroffen.

Zwar sind auch erfolgreiche Versuche zur konservativen Therapie des Ph durchgeführt worden (2), die gegenwärtig wirksame Therapie besteht jedoch in der operativen Entfernung des Tumors. Um die Resektion der oft nur kirsch- oder pflaumengroßen Geschwülste durchführen zu können, bedarf es zunächst einer exakten Lokalisation. Häufig wird versucht, mit Hilfe der röntgenologischen Darstellung der Nebennieren nach retroperitonealer Gasinsufflation das Ph zu lokalisieren. Diese und andere röntgenologischen Methoden führen jedoch oft zu unbefriedigenden Ergebnissen. Als Ursache für das Versagen der röntgenologischen Methoden können z. B. Verwachsungen im retroperitonealen Raum, eine unzureichende Gasfüllung, Kleinheit oder Doppelseitigkeit des Ph und eine Lokalisation außerhalb des retroperitonealen Raumes angeführt werden. (Ausführliche Darstellung der Pathogenese und Kli-

nik des Ph, siehe: H. SACK und J.F. KOLL: "Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde" (3).

Eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten, besonders im Hinblick auf die Lokalisation des Ph, erscheint deshalb sehr wünschenswert. Aus diesem Grunde verfolgen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen den Zweck, bessere Voraussetzungen für die Lokalisierung des Ph zu schaffen.

B) Problemstellung

Mit Hilfe von radioaktiv-markierten Substanzen sollte nun versucht werden, das chromaffine Gewebe des Nebennierenmarkes so zu kennzeichnen, daß es sich durch Messungen der Radioaktivität deutlich von anderen Gewebsarten differenzieren läßt.

Eine Substanz, die sich zur radioaktiven Kennzeichnung des Nebennierenmarkes mit diagnostischer Auswertung eignen soll, muß die folgenden Bedingungen erfüllen:

1. Sie muß im sympathischen Gewebe selektiv angereichert werden,
2. das radioaktive Isotop muß im Molekül der Substanz stabil eingebaut sein,
3. die Strahlungsenergie des Isotops muß so groß sein, daß die Radioaktivität an der Körperoberfläche noch meßbar ist,
4. das Risiko der zu verabreichenden Strahlendosis muß durch den Vorteil der verbesserten Diagnostik aufgewogen sein.

Aufgabe dieser Arbeit war es, Substanzen zu finden, welche die unter 1.) genannten Bedingungen erfüllen. Zwei Stoffgruppen kommen in erster Linie in Betracht:

1. Liberatoren der Catecholamine
2. Vorstufen der Catecholamine im Verlauf der Biosynthese.

Eine Reihe von Alkaloiden sind zur Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin befähigt, so setzt z. B. Nikotin Catecholamine aus dem Nebennierenmark frei (4). Es kann angenommen werden, daß an diesem Vorgang ein Austauschmechanismus beteiligt ist, bei dem das stark basische Nikotin die Catecholamine verdrängt, welche an die sauren Gruppen von Polyphosphaten, z. B. des ATP, gebunden sind. Für diese Ansicht sprechen Untersuchungen von HANSSON und SCHMITTERLÖW (5), die nach Verabreichung von C^{14} -markiertem Nikotin eine Anreicherung des Alkaloids in verschiedenen Organen, darunter auch im Nebennierenmark nachweisen konnten. Nikotin erscheint zur Diagnose des Ph jedoch nicht geeignet, weil die Freisetzung großer Mengen von Catecholaminen aus pathologisch vermehrten Depots zu einer unerwünschten Provokation führen könnte.

Als besser geeigneter Adrenalinliberator zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes wurde das Lobelin (6) gewählt und zwar aus folgenden Gründen: Die Freisetzung von Catecholaminen durch Lobelin ist sehr viel schwächer

als die durch äquimolare Nikotinmengen (7). Daher ist auch die blutdrucksteigernde Wirkung des Lobelin sehr viel geringer als die des Nikotin.

Als Vertreter der zweiten Stoffgruppe wurde Dihydroxyphenylalanin (DOPA) gewählt. Die Aminosäure Tyrosin wird durch Hydroxylierung in 3-Stellung im Organismus zu DOPA umgewandelt. Durch Decarboxylierung wird im intermediären Stoffwechsel das entsprechende Amin, das Dopamin, gebildet, welches durch β -Hydroxylierung zum Noradrenalin umgewandelt wird. Es war zu erwarten, daß DOPA als notwendige Vorstufe für die Catecholaminsynthese im Nebennierenmark angereichert wird.

Im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit erschien es besonders interessant, festzustellen, ob sich ein pathologisch vergrößertes Nebennierenmark durch die Markierung mit den erwähnten Substanzen gegen ein normales Nebennierenmarkgewebe abgrenzen läßt. Zu diesem Zweck verabfolgte ich Ratten längere Zeit subcutane Nikotininjektionen, um nach dem Vorgehen von STAEMMLER eine funktionelle Hyperplasie des Nebennierenmarkes zu erzeugen (8, 9).

Auf Grund der fortgesetzten nikotinbedingten Adrenalinausschüttung wird ein Reiz auf das chromaffine Gewebe ausgeübt, dessen Beantwortung in der Bildung einer funktionellen Hyperplasie bestehen soll. LUPULESCOU erzeugte derartige funktionelle Hyperplasien mit Hilfe von Insulininjektionen und nannte sie "experimentelle Phäochromocytoeme" (10).

Das Vorliegen solcher experimentellen Ph sollte durch Catecholaminbestimmungen in den Nebennieren und im 24-Stundenurin von normalen und nikotinbehandelten Ratten geprüft werden.

C) Methodischer Teil

Lobelin stand für meine Untersuchungen als tritiummarkiertes Lobelinhydrochlorid zur Verfügung, DOPA als C^{14} -markiertes Dihydroxyphenylalanin.

Zur Aktivitätsbestimmung des Gewebes und der beiden Substanzen standen mir die folgenden Methoden zur Verfügung:

1. Aktivitätsbestimmung des radioaktiven Materials im "Liquid Scintillation Spectrometer"
2. Dünnschichtchromatographie von Gewebsextrakten und Zählung der Dünnschichtaktivität im "Liquid Scintillation Spectrometer".

I. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler und nikotinbehandelter Ratten mit tritiummarkiertem Lobelin

Alle Bestimmungen der Radioaktivität von Substanzen bzw. Gewebe wurden in einem "Liquid Scintillation Spectrometer", Modell 314 EX, der Firma Packard durchgeführt.

Das radioaktive Material wird in einem flüssigen Scintillator gelöst oder mit Hilfe von "Thixotropic Gel Powder" suspendiert (11, 13, 14). Die ionisierende Strahlung regt den Scintillator zur Emmission von Lichtblitzen (Lumineszenz) an. Die Zahl der Lichtblitze wird vom Scintillationszähler registriert. Sie entspricht der von einem elektronischen Anzeigergerät aufgezeichneten Impulsrate, die in "ipm" (impulse per minute) angegeben wird. Die Impulsrate ist der Zahl der radioaktiven Zerfälle proportional, d.h., daß sie einen bestimmten Prozentsatz der Zahl der radioaktiven Zerfälle darstellt. Zur Bestimmung dieses Prozentsatzes, der Zählausbeute genannt wird, muß der Probe eine definierte Menge Radioaktivität in Form des sogenannten "internal standard" zugefügt und eine zweite Zählung durchgeführt werden. Die Impulsdifferenz beider Zählungen entspricht der Zählausbeute. Mit Hilfe der Zählausbeute kann die Zahl der radioaktiven Zerfälle leicht errechnet werden. Sie werden in "dpm" (disintegrations per minute) angegeben. Damit erhält das Ergebnis absoluten Wert. Die Bestimmungen der Zählrate allein haben hingegen nur für vergleichende Messungen Bedeutung, wobei gleiche Versuchsbedingungen erforderlich sind.

Bei allen Messungen muß der Nulleffekt berücksichtigt werden.

(Grundlagen über Scintillationszählung, siehe: N. GETOFF: Kurzes radiochemisches Praktikum" u. a. (12, 13, 14)).

Bei sämtlichen Untersuchungen verwendete ich immer das gleiche Scintillationssystem mit folgender Zusammensetzung:

7,0 g PPO[†])
0,3 g POPOP[†])
100,0 g Naphthalin
ad 1000 ml Dioxan.

1. Aktivitätsbestimmung des tritierten Lobelin in wässriger Lösung

Die Tritierung des Lobelinhydrochlorid erfolgte nach der Methode von WILZBACH (15).

a) Zur Reinigung des tritierten Lobelin durch Austausch labil gebundener Tritiumatome gegen Wasserstoffatome des Lösungsmittels Wasser wird die Gesamtmenge des tritierten Lobelin (100 mg) in ca. 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird in einem geeigneten Gefäß eingefroren und lyophilisiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis das Lobelin eine konstante spezifische Aktivität aufweist.

b) Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des lyophilisierten Lobelin werden aus je 3,5 und 10 mg lyophilisiertem Lobelin wässrige Lösungen mit Konzentrationen von 10 µg/ml und 1 µg/ml hergestellt. Je nach zu bestimmender Substanzmenge werden 0,1-0,5 ml der Lobelinlösung in ein Zählglaschen einpipettiert. Mit Hilfe einer automatischen Bürette werden 20 ml Dioxan-scintillator hinzugefügt. Nach Verschluss des Glaschens und Abdichtung des Deckels mit einer Scheibe PVC-Folie wird die Probe kurz und kräftig geschüttelt. Die gefüllten Zählglaschen werden dann in den Scintillationszähler gebracht und stehen dort bis zum Beginn der Zählung zum Temperatúrausgleich 3-4 Stunden. Die Messung der Tritiumaktivität erfolgt bei einer Spannungseinstellung von 6,7.

Erste Zählung: Es werden mindestens 1000 Impulse gezählt.

Zweite Zählung: In jedes Glaschen werden nach der ersten Messung 0,1 ml tritiertes Wasser mit einer spezifischen Aktivität von $2,0 \times 10^5$ dpm/ml (inter-

†) Scintillationssubstanzen; von der Firma Packard erhältlich.

nal standard) einpipettiert. Danach werden die Gläschen mit einer neuen Scheibe PVC-Folie verschlossen und erneut zur Zählung in das Gerät gestellt. Aus der Impulsrate (ipm) wird nun nach folgendem Rechenvorgang die absolute Zahl der radioaktiven Zerfälle (dpm) jeder Probe ermittelt:

$$\text{Zählausbeute} \quad = \quad \frac{(b-a)}{2 \times 10^2} \quad a = \text{ipm der ersten Zählung}$$

(%)

$$\text{Absolute Zahl} \quad = \quad \frac{(a-1) \times 2 \times 10^4}{(b-a)} \quad b = \text{ipm der zweiten Zählung}$$

der radioakti-
ven Zerfälle
(dpm) \quad \quad \quad 1 = \text{Nulleffekt}

Der Leerwert (Nulleffekt) wird durch Zählung einer Probe ohne radioaktives Material ermittelt. Da er sich in Abhängigkeit von der Farbe der Meßprobe ändert, wurde eine entsprechende Korrektur angebracht. Die Veränderung des Nulleffekts entspricht ungefähr der Verminderung der Zählausbeute bei zunehmender Färbung der Probe.

2. Reinheitsbestimmung des aktiven Lobelin durch Aufnahme des Absorptionsspektrums im UV-Licht im Vergleich zu nichtmarkiertem Lobelin

Die Lobelinlösungen werden in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke im Bereich von 247,0 mμ bis 251,0 mμ im Spektrophotometer Zeiß PM QII alle 0,2 mμ gemessen und die Extinktionswerte in einer Tabelle zusammengefaßt.

3. Untersuchung der Aktivitätsverteilung im Rattenorganismus nach intravenöser Injektion von tritiiertem Lobelin

Das tritiummarkierte Lobelin wurde weiblichen Ratten mit einem Gewicht von 250-350 g in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach Wägung des Versuchstieres wird von einer H³-Lobelinlösung (1 mg/ml) die dem Körpergewicht entsprechende Menge abpipettiert und aus einem Reagenzglas zusammen mit ca. 1,5 ml physiologischer Kochsalzlösung in die Injektionsspritze aufgezogen und in die Schwanzvene injiziert. Nach gemessenen Zeiten wird das Tier mit Äther narkotisiert und durch Decapitieren getötet. Nach Auffangen des Blutes in einem 2 ml 3,8 %igen Citratlösung

beschickten 10 ml Meßzylinder werden Nebennieren, Nieren, Pankreas, Leber, Milz, Dünndarm, Lunge, Herz und Gehirn rasch aus dem Körper entfernt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung in einer Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Radioaktivität des Organgewebes wird von den gefrorenen Organen ein Stück zum Auftauen abgeschnitten. Die Gläschen für den Scintillationszähler werden mit "Thixotropic Gel Powder" gefüllt. Danach werden von den aufgetauten Organstückchen je 30 mg abgewogen und in einem 5 ml Glas-homogenisator in 5 ml Dioxanscintillator homogenisiert. (Die Nebenniere wird abgewogen und im Ganzen homogenisiert.) Das Homogenat wird in eins der vorbereiteten Zählgläschen eingefüllt. Der Homogenisator wird noch 3mal mit 5 ml Scintillator gefüllt und betätigt, um das Homogenat quantitativ zu erfassen. Nachdem auf diese Weise 4mal 5 ml Scintillator in ein Gläschen gefüllt worden sind, wird es verschlossen und 30 Minuten lang maschinell geschüttelt. Nachdem das Homogenat gleichmäßig suspendiert ist, werden die Proben in den Scintillationszähler gebracht.

Die Zählung der Impulse und Berechnung der Radioaktivität erfolgt in der gleichen Weise, wie es in Abschnitt 1 b) S. 6 beschrieben ist.

Die Ergebnisse werden in einer Tabelle zusammengestellt, nachdem sie auf Aktivität pro 10 mg Organ gewebe umgerechnet worden sind.

Zur Aktivitätsbestimmung des Blutes werden 0,02 ml Citratblut homogenisiert. Unter Berücksichtigung des Citratanteils und der Dichte des Blutes wird das Ergebnis auf 1 mg Blut umgerechnet.

4. Dünnschichtchromatographie der Gewebsextrakte von mit H^3 -Lobelin behandelten Ratten

Zur Dünnschichtchromatographie des tritierten Lobelin (H^3) aus Gewebsextrakten von Nebennieren, Lunge und Pankreas werden 20 mg des zu untersuchenden Gewebes in 10 ml Cyclohexan homogenisiert, wobei das Auftauen des Gewebes vor dem Homogenisieren möglichst zu vermeiden ist. Das Homogenat wird mit 4 ml 0,001 n HCl 20 Minuten lang geschüttelt. Nach der Trennung der Phasen durch Zentrifugieren und Absaugen der organischen Phase wird die wässrige Phase mit 3 Tropfen 0,5 n NaOH alkalisiert und mit 10 ml Chloroform 30 Minuten lang geschüttelt. Die Chloroformphase wird abgetrennt und in ein Kölbchen gefüllt, das an eine Vakuumpumpe angeschlossen wird. Unter vorsichtigem Schwenken des Kölbchens in einem Wasserbad von ca. $25^{\circ}C$ wird die Chloroformphase auf 0,1-0,2 ml eingengt.

Zur Chromatographie wird der Chloroformextrakt quantitativ auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Dem Auftragsfleck wird in Form einer Chloroformlösung 5-10 μg nichtradioaktives Lobelinhydrochlorid zugefügt ("Mischchromatogramm"). Die Trennschicht besteht aus Kieselgel, das mit NaOH zubereitet worden ist. Als Fließmittel wird Methanol verwendet. Nach dem Ende der Laufzeit wird das Chromatogramm mit Dragendorff's Reagenz angefärbt. Durch das beigemengte kalte Lobelin wird der Rf-Wert des Lobelin genau bestimmbar.

Zur Bestimmung der Aktivität wird das Chromatogramm in Areale eingeteilt. Das Kieselgel der zu bestimmenden Areale wird abgekratzt, im Scintillator homogenisiert und mit Hilfe von Thixotropic Powder im Scintillator suspendiert. Um das Kieselgel des Lobelinflecks zu entfärben, werden vor dem Homogenisieren 1-2 Tropfen 5 n NaOH zugefügt. Damit verbessert sich die Zählausbeute der Probe.

Die Zählung wird, wie in Abschnitt 1 b) S. 6 beschrieben, durchgeführt.

5. Bestimmung der Aktivität und des Lobelingehaltes des Nebennierenmarkes

Die Bestimmung der Aktivität und des Lobelingehaltes des Nebennierenmarkgewebes wird nach der in den Abschnitten 3) und 4) beschriebenen Methode durchgeführt. Allerdings ist hier immer nur eine sehr kleine Menge von Gewebe (ca. 4 mg) für die Bestimmung vorhanden. Die Präparation des Nebennierenmarkes wird folgendermaßen durchgeführt:

Eine frische Rattennebenniere wird mit 2 kleinen Pinzetten freipräpariert und dekapsuliert. Dann wird die Nebenniere auf ein kleines Stück trockenen Zellstoffs gelegt. Hier wird sie mit der Pinzette hin und her gewälzt, so daß die feuchte Rinde nach und nach am Zellstoff haften bleibt und schließlich nur noch das dunkle Mark übrig ist, welches gewogen und zur Bestimmung verwendet wird.

Um die Aktivität der Rinde zu messen, kann man das Zellstoffstück mit der Rinde ausschneiden und ebenfalls homogenisieren und suspendieren oder davon einen Extrakt herstellen. Zur Bestimmung des Rindengewichts muß die Nebenniere abgewogen werden. Aus Gewicht des Markes und der Nebenniere läßt sich das Rindengewicht errechnen.

II. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler und nikotinbehandelter Ratten mit C^{14} -markiertem DOPA

Für diese Untersuchungen verwendete ich von der Firma "Radiochemical Centre", Amersham, England, geliefertes DL-3(3, 4-Dihydroxyphenyl)-alanin-2- C^{14} (1,73 mg $\hat{=}$ 0,05 mCi). 250-300 g schweren Ratten wurde eine Dosis von 20 μ C/kg intravenös verabreicht. Gleichzeitig wurde pro Injektion 1 mg nichtaktives DOPA (L(-)-Dihydroxyphenylalanin von der Firma F. Hoffmann-La Roche) mitinjiziert.

Die Tiere wurden 0,5, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach der Injektion getötet.

Die Methodik der Aktivitätsbestimmung der Organgewebe unterscheidet sich nur in folgenden Punkten von der Methodik nach H^3 -Lobelininjektion:

1. Die Organe werden lyophilisiert.
2. Von dem lyophilisierten Gewebe werden je 10 mg im Scintillator homogenisiert und mit Hilfe von Thixotropie Gel Powder suspendiert.
3. Die Zählung der C^{14} -Aktivität erfolgt bei einer Spannungseinstellung von 3,4.
4. Zur Bestimmung der Zählisausbeute werden 0,1 ml eines Toluol- C^{14} -Standards ("internal standard") mit einer Aktivität von $12,0 \times 10^4$ dpm/ml verwendet.

Die Ergebnisse werden auf Impulszahl pro Minute (dpm) und 10 mg Frischgewicht umgerechnet. Zur Bestimmung der Beziehung zwischen Frischgewicht und Gewicht des lyophilisierten Gewebes müssen die Organe vor und nach dem Lyophilisieren abgewogen werden.

Bei einem abschließenden Versuch wurde einem Tier im Laufe von 2 Tagen 20 μ C C^{14} -DOPA injiziert. Es wurde 7 Tage nach der letzten Injektion getötet. Von Nebennierenmark, Nebenniere, Niere, Pankreas, Leber und Milz wurde die Aktivität gemessen.

III. Nikotinbehandlung von Ratten zur Erzeugung einer funktionellen Hyperplasie des Nebennierenmarkes

Einer Gruppe von 70 weiblichen Ratten wurden, beginnend mit einem Lebensalter der Tiere von 4 Monaten, 3mal wöchentlich 1,4 mg/kg Nikotin, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, 1 Jahr und 4 Monate lang subcutan injiziert. Zur Kontrolle wurden 30 Tiere ebenso lange 3mal wöchentlich nur mit einer

entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

Nach STAEMMLER (8) war zu erwarten, daß sich bei dieser Behandlung funktionelle Hyperplasien des Nebennierenmarkes oder sogar Adenome (9) entwickeln. Wie bereits erwähnt, sollte der Nachweis der funktionellen Hyperplasie durch Catecholaminbestimmungen im Urin und in den Nebennieren erbracht werden.

Es kamen folgende Methoden zur Anwendung:

1. Bestimmung der Catecholamine im 24-Stundenharn

Von je 2 in einem Stoffwechselkäfig gehaltenen Ratten wird der 24-Stundenurin in 5 ml 0,01 n HCl aufgefangen. Nach Abtrennen der groben Verunreinigungen durch Zentrifugieren wird der Urin mit konzentrierter HCl auf pH 3 eingestellt und 20 Minuten im siedenden Wasserbad der Hydrolyse unterworfen. Nach Erkalten des Urins wird dieser filtriert und in ein 50 ml Becherglas gefüllt. Das Filter wird mit destilliertem Wasser gespült. Zur Adsorption der basischen Amine werden dem Urin 1,5 g saures Aluminiumoxyd zugesetzt. Der Urin wird dann am pH-Meter unter dauerndem Umrühren mit einem Magnetrührer durch tropfenweises Hinzufügen von 0,5 n NaOH auf pH 8,5 eingestellt. Danach wird das Aluminiumoxyd abgetrennt (zentrifugieren) und zweimal mit ca. 4 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach erneutem Abtrennen des Aluminiumoxyds erfolgt die Elution der Catecholamine mit einmal 4 ml und einmal 2 ml 0,5 n H_2SO_4 . Zu diesem Zweck wird das Aluminiumoxyd im Zentrifugenglas gelassen und die Säure zugesetzt. Dann wird 20 Minuten durch intensives Umrühren mit einem Glasstab eluiert. Bei der zweiten Elution genügen gewöhnlich 10 Minuten. Wenn der Gehalt an Catecholaminen im zweiten Eluat größer ist als im ersten, muß ein drittes Mal eluiert werden.

Die nun folgende Bestimmung der Catecholamine erfolgte genau nach der Vorschrift von EULER und FLODING (17). Die Messung wird in einem Zeiß-Fluorimeter durchgeführt. Die Meßprobe wird mit einer Frequenz von 365 m μ zur Fluoreszenz angeregt. Die Messung erfolgt bei 530 m μ . Der Harn nikotinbehandelter Ratten wird erst 2 Tage nach der letzten Nikotininjektion untersucht.

2. Bestimmung der Catecholamine im Harn nach Reserpininjektion

BICKEL und Mitarbeiter fanden, daß nach Reserpininjektion im menschlichen

Harn vermehrt Catecholamine ausgeschieden werden (18). Deshalb wurde 2 normalen und 2 nikotinbehandelten Ratten Reserpin (1 mg/kg, in einer 5%igen Ascorbinsäurelösung gelöst) subcutan injiziert. Unmittelbar danach wurde der 24-Stundenharn gesammelt und in der unter 1) beschriebenen Weise die Catecholaminbestimmung durchgeführt.

3. Bestimmung des Catecholamingehaltes der Nebennieren:

Zur Extraktion der Catecholamine wird eine Nebenniere (15-30 mg) in 1,6 ml 0,01 n HCl homogenisiert. Das Homogenat wird mit 12 ml Butanol und 1,4 g NaCl 1 Stunde lang ausgeschüttelt. Nach Zentrifugierung werden 10 ml der Butanolphase mit 1,6 ml 0,01 n HCl und 20 ml Heptan 15 Minuten lang ausgeschüttelt. Danach wird schwach zentrifugiert und 1,6 ml der HCl-Phase entnommen. 1 ml dieser Phase entspricht dann 51,4 % der eingesetzten Ausgangsmenge (19).

Mit 0,1 ml des Extrakts wird die Bestimmung der Catecholamine nach der Methode von EULER und FLODING durchgeführt (17).

D) Ergebnisse

I. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler und nikotinbehandelter Ratten mit tritiiertem Lobelin

1. Bestimmung der spezifischen Aktivität des tritiierten Lobelin

Die Tritierung nach der Methode von WILZBACH beruht auf der Tatsache, daß bei Inkubation einer organischen Substanz mit Tritium (T_2), z. B. Lobelin, im Verlauf einer gewissen Zeit möglichst viele Wasserstoffatome gegen Tritiumatome ausgetauscht werden. Es entstehen dabei jedoch neben stabilen C-T-Bindungen auch labile O-T- und N-T-Bindungen. Bei der Tritierung von Lobelin wurden 100 mg Substanz mit 1 Curie Tritiumgas 2 Wochen lang inkubiert. Nach abgeschlossener Tritierung sollen alle labil gebundenen Tritiumatome wieder gegen Wasserstoffatome ausgetauscht werden, um so eine konstante spezifische Aktivität der tritiierten Substanz zu erhalten. Zu diesem Zweck löste ich das Lobelin mehrere Male in Wasser und lyophilisierte es danach jedesmal. Dabei wurde labil gebundenes Tritium gegen Wasserstoff des Wassers ausgetauscht. Dieser Vorgang mußte so oft wiederholt werden, bis die Aktivität der Lyophilisate nicht mehr absank. Zunächst hatte das Lobelin eine hohe Aktivität von 25-30 $\mu\text{C}/1 \text{ mg}$. Tabelle 1 enthält Angaben über die Aktivität der einzelnen Lyophilisate. Es ist zu sehen, daß die Aktivität zwischen 5. und 6. Lyophilisat nicht mehr abfällt.

Tabelle 1: Impulsraten von je 5 μg tritiiertem Lobelin nach mehrmaligem Lyophilisieren

	4. Lyophilisat	5. Lyophilisat	6. Lyophilisat
1. Bestimmung	18 647 ipm	15 249 ipm	16 927 ipm
2. Bestimmung	19 426 ipm	15 323 ipm	16 767 ipm

Die Erhöhung der Aktivität des 6. gegenüber dem 5. Lyophilisat ist auf Fehler beim Einwiegen der sehr geringen Lobelinmengen von je 3 mg zurückzuführen. Bei der vergleichenden Untersuchung der einzelnen Lyophilisate war eine Bestimmung der Zählausbeute und der absoluten Zahl der radioaktiven Zerfälle (dpm) der einzelnen Proben nicht notwendig, da bei allen Messungen gleiche Versuchsbedingungen hinsichtlich der Zählausbeute und der Zählrate vorlagen.

Bei 6 Bestimmungen von 4 Lobelinlösungen wurde nach Lyophilisierung für $1\text{ }\mu\text{g}$ Lobelinhydrochlorid in wässriger Lösung eine Aktivität von 33 $\pm$ 120 dpm (mittl. Fehler 3,9%) gemessen. 1 mg tritiiertes Lobelinhydrochlorid hatte demzufolge eine Aktivität von 15,3 μC .

2. Photometrische Reinheitsbestimmung des tritiierten Lobelin

Das Absorptionsmaximum des nichtmarkierten Lobelin erstreckt sich von 248,0 - 250,0 m μ und das des tritiierten Lobelin von 247,2 - 249,8 m μ . Das entspricht einer Verschiebung des Maximums von tritiiertem Lobelin gegenüber nichtmarkiertem um 0,5 m μ . Da es sich hier um relativ breite Maxima handelt, kann die Abweichung von 0,5 m μ nicht als Zeichen einer nennenswerten (mengenmäßigen) Verunreinigung angesehen werden.

3. Aktivitätsverteilung im Rattenorganismus nach intravenöser Injektion von tritiiertem Lobelin bei normalen und nikotinbehandelten Ratten

Aus Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Aktivitätsverteilung bei 12 normalen und 13 nikotinbehandelten Ratten zu ersehen. In der äußersten linken Spalte ist die Zeit zwischen Injektion und Tod des Versuchstieres eingetragen. Die Werte unter 1 entstammen Aktivitätsbestimmungen der Organe normaler Tiere, unter 2 nikotinbehandelter Tiere. Alle Angaben haben die Bezeichnung dpm (disintegrations per minute) und beziehen sich auf 10 mg Frischgewebe. Die Werte unter 1/3' und 14/15' entstammen je 2 Versuchen, während alle anderen Werte nur aus einer Bestimmung gewonnen wurden.

Die Zählausbeute schwankte je nach Farbe der Probe und Zählrate zwischen 4,5 und 11,0%.

Für die Skelettmuskulatur, die nicht aufgeführt ist, wurde von einem normalen Tier nach 5 Minuten eine Aktivität von 58 dpm/mg und nach 15 Minuten 25 dpm/mg Frischgewebe gefunden. Die weitere Untersuchung der Muskulatur wurde wegen der niedrigen Werte nicht für notwendig gehalten.

Aus der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß 17 Minuten nach Injektion des Lobelin die Organe Nebennieren, Niere, Leber, Milz und Lunge (4,7% des Körpergewichts) 6,0% der injizierten Aktivität enthalten. In den entsprechenden Organen einer Ratte, die 24 Stunden nach der Injektion getötet wurde, befinden sich nur noch 2,8% der injizierten Aktivität, während 31,2% im Kot und im Urin ausgeschieden werden; in Herz, Gehirn, Intestinaltrakt, Pankreas und im Blut (10,3% des Körpergewichts) der 24-Stunden-Ratte befinden sich noch 4,4% der Aktivität.

Tabelle 2: Verteilung der H^3 -Aktivität im Rattenorganismus nach intravenöser Injektion von H^3 -
Lobelinhydrochlorid in "dpm" pro 10 mg Frischgewebe
1-11 normale Tiere; 12-23 nikotinbehandelte Tiere; (weitere Erläuterungen im Text)

Tier Nr.	Zeit nach Injektion	Nebenniere	Lunge	Pankreas	Leber	Niere	Milz	Darm	Herz	Gehirn	Blut
1	5'	4900	13500	3900	2290	4790	1990	1670	1530	490	640
2	10'	3170	2530	-	1700	2220	1070	-	900	280	360
3	15'	3650	4030	2130	1580	2210	-	890	710	240	570
4	17'	1810	2260	-	1270	1920	1040	-	520	260	390
5	30'	1680	1870	-	1370	1810	830	550	410	130	310
6	60'	1390	1130	-	1190	850	820	470	340	100	350
7	2h	1020	880	-	890	640	470	540	170	80	420
8	4h	1080	2050	2080	1010	860	830	360	260	80	270
9	10h	560	710	2250	630	520	740	220	190	20	230
10	20	450	310	1140	460	360	370	160	150	40	180
11	24h	690	400	1680	410	530	410	160	160	30	260
12	5'	3140	5920	-	990	2650	1060	960	1250	370	700
13	10'	1480	2300	790	530	1110	380	400	540	150	-
14	15'	4970	10030	-	2180	3870	1630	1280	1240	-	610
15	20'	4670	6040	-	1020	3070	1900	330	1020	330	490
16	30'	3280	5600	2560	580	1740	1370	720	580	270	380
17	60'	2490	-	2660	1630	1620	1790	2410	530	740	280
18	90'	1520	2100	-	1660	1140	1520	-	420	140	310
19	2h	1430	1500	2900	1480	1000	840	360	460	90	570
20	4h	1280	2470	2020	1170	960	1080	400	360	60	220
21	14h	610	520	810	580	560	150	200	190	20	160
22	20h	690	330	1280	480	400	390	130	160	20	970
23	24h	180	230	-	140	140	190	0	0	0	0

In Bezug auf die Fragestellung der Arbeit sind die folgenden Befunde von besonderer Wichtigkeit:

1. Pankreas und Niere zeigen einen gleichgroßen, Lunge einen wesentlich höheren Aktivitätsgehalt als die Nebennieren.
2. Bei Nebennieren, Lunge, Leber, Niere, Milz, Darm, Herz und bei Blut sind nach 5 Minuten und 15 Minuten Aktivitätsmaxima nachweisbar.
3. Der 5-Minuten-Gipfel ist bei den normalen, der 15-Minuten-Gipfel besonders bei den nikotinbehandelten Ratten ausgeprägt.
4. Die Aktivität des Pankreas verringert sich relativ langsam.
5. Im allgemeinen ist die Aktivität in den Organen der nikotinbehandelten Ratten größer als in den Organen der Normaltiere. (Siehe Tabelle 2 S. 15)

4. Dünnschichtchromatographie von Gewebsextrakten

a) Bei Verwendung der Fließmittel Methanol und Chloroform-Aceton-Diäthylamin (5:4:1) wurde für Lobelinhydrochlorid ein Rf-Wert von $R_f = 0,55$ bzw. $R_f = 0,9$ festgestellt. Die Rf-Werte des tritierten Lobelin stimmten mit denjenigen des kalten Lobelin überein. Das tritierte Lobelin wurde in Mengen von $1 \mu\text{g}$ oder $0,5 \mu\text{g}$ in wäßriger Lösung aufgetragen, das nichtmarkierte Lobelin in Mengen von $5 - 10 \mu\text{g}$.

Bei der Chromatographie von $1 \mu\text{g}$ ^3H -Lobelin wurde festgestellt, daß dem Lobelinfleck nur eine Aktivität von 10 300 dpm zukam. Das bedeutet einen Aktivitätsverlust um 69 % der Aktivität von $1 \mu\text{g}$ Lobelin in wäßriger Lösung. 92 % der aufgetragenen Gesamtaktivität wurden bei der Bestimmung über das ganze Chromatogramm verteilt, wiedergefunden. Nur 31 % der Aktivität entfielen auf den Lobelinfleck, 69 % waren über das ganze Chromatogramm verteilt, konzentrierten sich jedoch auf je einen Aktivitätsgipfel am Start und am Ende des Chromatogramms (siehe Abbildung 1 S. 17).

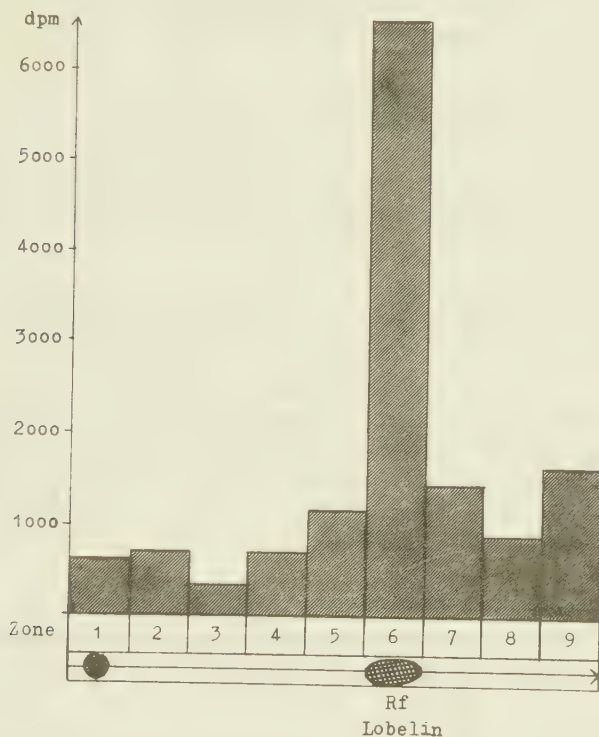
Nach der Extraktion von $1 \mu\text{g}$ Lobelin aus wäßriger Lösung und Chromatographie des Extrakts hatte der Lobelinfleck nur noch eine Aktivität von 5 450 dpm (mittl. Fehler 2,7 %).

Bei diesen Untersuchungen wurden Zählansbeuten von 8-10 % gefunden (im Scintillator suspendiertes Kieselgel).

Es war nicht Aufgabe dieser Arbeit, die Ursache für den Aktivitätsverlust aufzuklären, es war für die Fragestellung auch nicht erforderlich, eine exakte quantitative Relation zwischen Substanzmenge und Aktivität nach Extraktion und Chromatographie zu finden. Mit Hilfe der Chromatographie sollte nur die

Abbildung 1:

Dünnschichtchromatographie von 0,5µg ^3H -Lobelin



relative Konzentration des Lobelin in den Organen bestimmt werden. Als Näherungswert galt dabei, daß 5 450 dpm des Lobelinflecks etwa 1 µg extrahiertem Lobelin entsprechen.

(Allen weiteren Angaben des Lobelingehaltes von Gewebe liegt diese Beziehung zugrunde.)

Diskussion zum Abschnitt C, I

Die in Abschnitt C, I, 2, Seite 14 beschriebene photometrische Messung der Absorptionsmaxima des Lobelin ergab keine wesentlichen (mengenmäßigen) Verunreinigungen infolge des Tritierungsverganges. Es können daher die in Ab-

bildung 1. Seite 17 sichtbaren beiden kleineren Aktivitätsgipfel nicht unbedingt auf Verunreinigungen zurückgeführt werden. Mit folgenden Überlegungen soll versucht werden, die beobachtete Aktivitätsverteilung zu deuten

Durch die intensive Behandlung des Lobelin mit alkalischen Medien während Extraktion und Chromatographie kommt es im Sinne der folgenden Reaktion zur Abspaltung von Tritium:

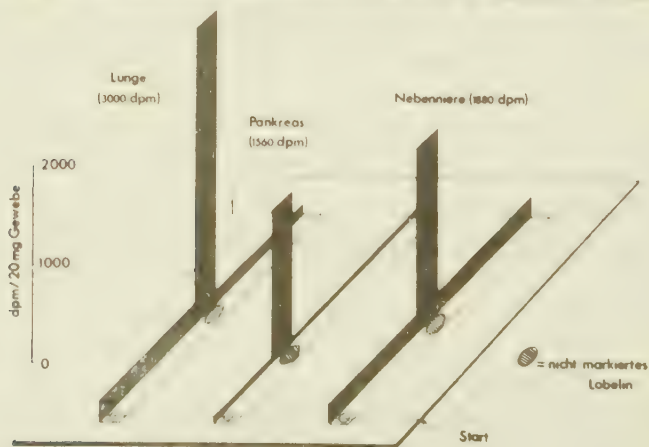


Die hohe Konzentration von Hydroxylionen bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts nach der rechten Seite. Dieser Vorgang läuft so lange ab, bis alle Lobelin-T⁺-Ionen in die freie basische Form des Lobelin übergeführt sind.

Bei der Dünnschichtchromatographie besteht die Trennschicht aus einem Gemisch von Kieselgel und NaOH. Diese Alkalisierung hat den Sinn, das Lobelinhydrochlorid in die freie Base Lobelin umzuwandeln. Erst in dieser Form ist das Lobelin in einigen organischen Lösungsmitteln, wie z. B. in Methanol und Cyclohexan, löslich. Nach Beginn der Chromatographie reagiert also das Lobelinhydrochlorid mit der Natronlauge im Sinne der genannten Reaktion.

Abbildung 2:

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMM VON ORGANEXTRAKTEN NACH IV-INJEKTION VON ³H-LOBELIN



Während das Lobelin weiter wandert, bleibt diese Aktivität am Reaktionsort liegen und trägt so zur Entstehung des Aktivitätsgipfels am Anfang des Chromatogramms bei. Schon von Beginn an wird aber auch ein Teil des Tritiums gegen Wasserstoff des Fließmittels ausgetauscht:



Es ist nicht anzunehmen, daß der Austausch von Tritium zwischen Lobelin und dem Fließmittel-Trennschicht-System während der Dauer der Chromatographie zu irgendeinem Zeitpunkt ganz aufhört. Man kann also sagen, daß das tritierte Lobelin unter wechselnden Versuchsbedingungen erheblichen Schwankungen seiner spezifischen Aktivität unterworfen ist. Die Ergebnisse eignen sich daher nur für vergleichende Untersuchungen.

Der Aktivitätsgipfel an der Fließmittelfront kann nicht allein durch Austauschvorgänge erklärt werden.

Hier handelt es sich wahrscheinlich um hochaktive, aber mengenmäßig geringfügige Verunreinigungen. Da durch die Chromatographie die relative Konzentration des Lobelin in den Organen eindeutig bestimmt werden konnte, brauchten die Verunreinigungen nicht berücksichtigt zu werden. Der Wert der Untersuchungen der Aktivitätsverteilung (Abschnitt 3) wird durch das Vorhandensein der Verunreinigung jedoch erheblich vermindert.

b) Von einer 15 Minuten nach der Lobelininjektion getöteten Ratte wurden Lunge, Pankreas und Nebennieren auf ihren Gehalt an Lobelin untersucht. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus je 2 Versuchen.

Aus der Abbildung 2 Seite 18 ist das Verhältnis des Lobelingehaltes der einzelnen Organe zueinander zu ersehen.

Die Laufstrecke jedes Extraktes wurde in 3 Zonen eingeteilt:

1. Zone: Startlinie bis Beginn des Lobelinflecks
2. Zone: Lobelinfleck
3. Zone: Ende des Lobelinflecks bis Fließmittelfront.

Die Aktivität dieser Zonen wurde gemessen. Es kam nicht darauf an, die Zonen vor und nach dem Lobelinfleck differenziert zu untersuchen, da nur in der Zone des Lobelinflecks mit unveränderter Substanz zu rechnen war.

Aus der Abbildung geht hervor, daß die Lunge entsprechend ihrer Aktivität auch die höchste Lobelinkonzentration besitzt. Die Nebenniere hat nur etwa 2/3 der Lobelinkonzentration der Lunge, Pankreas nur die Hälfte.

Von Ratten, die nach 5 Minuten und nach 14 Stunden getötet worden waren, untersuchte ich den Lobelingehalt der Nebennieren. Bei allen Chromatographien der Nebennierenextrakte fand ich über dem Lobelfleck ca. 25 % der früher bestimmten Gesamtaktivität des Gewebes.

Unter Verwendung der unter 4 a) genannten quantitativen Beziehung zwischen Aktivität und Substanzmenge ($5450 \text{ dpm} = 1 \mu\text{g Lobelin}$) kann der Lobelingehalt auch in Gewichtseinheiten ungefähr angegeben werden:

Nach der Injektion von 2 mg Lobelin pro kg Körpergewicht enthalten Lunge ca. $0,28 \mu\text{g}$, Nebenniere ca. $0,17 \mu\text{g}$ und Pankreas ca. $1,14 \mu\text{g Lobelin}$ pro 10 mg Gewebe.

5. Bestimmung der Aktivität und des Lobelingehaltes des Nebennierenmarkes

Auf Grund der Arbeitshypothese erwartete ich in der Nebennierenrinde einen geringeren Lobelingehalt als im Nebennierenmark. Es war also notwendig, Mark und Rinde getrennt zu untersuchen.

Von einer Rattennebenniere konnte jedoch nicht Mark und Rinde getrennt untersucht werden, da die Rinde bei der Präparation des Markes verloren ging. Infolgedessen wurde von jedem Versuchstier eine Nebenniere als ganzes wie bisher bestimmt und von der anderen nur das Nebennierenmark.

Wenn die Lobelinverteilung den Erwartungen entsprach, mußte das Nebennierenmark eine höhere Lobelinkonzentration aufweisen als die gesamte Nebenniere. Dabei wurde allerdings davon ausgegangen, daß das Mengenverhältnis zwischen Mark und Rinde beider Nebennieren etwa gleich ist.

Hauptsächlich sollte mit dieser Untersuchung geprüft werden, ob der Lobelingehalt des Nebennierenmarkes gegenüber demjenigen der Lunge im Sinne der Problemstellung als ausreichend anzusehen ist.

Bei der chromatographischen Differenzierung des Lobelingehaltes von Mark und Rinde wurden nur unbehandelte Ratten, die 15 Minuten nach der Lobelininjektion getötet worden waren, verwendet. Die Chromatographie ergab folgende Werte:

Tabelle 3: Vergleich des H^3 -Lobelingehaltes von Nebennierenmark und Nebennieren

Versuch Nr.	Nebennierenmark $\mu g/10 \text{ mg}$	Nebenniere $\mu g/10 \text{ mg}$
1	0,50	0,18
2	0,33	-
3	-	0,21
4	0,35	0,39
Mittelwert	0,39	0,22
5	1,08	0,24
6	-	0,46
Mittelwert	-	0,38

1.-4.: Normale Tiere, 5. und 6.: Nikotinbehandelte Tiere

$1,0 \mu g = 5450 \text{ dpm}$

Nebennieren enthalten 0,18 - 0,39 μg Lobelin, das Nebennierenmark 0,33 - 0,50 μg Lobelin pro 10 mg Gewebe.

Daraus kann geschlossen werden, daß die Nebennierenrinde weniger Lobelin enthält als das Nebennierenmark. Außerdem ist damit bewiesen, daß sich das Lobelin im sympathischen Gewebe des Nebennierenmarkes vor allen anderen Organen selektiv anreichert. Lunge und Pankreas enthalten jedoch mit 0,28 μg und 0,17 μg pro 10 mg Gewebe auch erhebliche Lobelinmengen.

II. Untersuchungen zur Kennzeichnung des Nebennierenmarkes normaler (und nikotinbehandelter) Ratten mit C^{14} -DOPA

Nach C^{14} -DOPA-Injektion untersuchte ich die Verteilung der C^{14} -Aktivität im Rattenorganismus. Die Aktivität in Blut, Lunge, Gehirn, Milz und Herz war von Anfang an gering oder sank im Verlauf von 0,5 - 120 Stunden stark ab, so daß auf die Anführung der Werte verzichtet werden kann.

Die Aktivitätsverteilung in Nebennieren, Nieren, Leber und Pankreas ergab folgende Werte (bei diesen Versuchen wurde das lyophilisierte Gewebe noch nicht im Scintillator homogenisiert, sondern nur mit einem Spatel zerkleinert):

Tabelle 4: Aktivitätsverteilung nach Injektion von C^{14} -DOPA

Stunden nach der Injektion	Nebennieren dpm	Nieren dpm	Leber dpm	Pankreas dpm
0,5	110	385	230	-
24	110	100	35	-
72	125	80	25	-
96	115	45	13	0

Angaben beziehen sich auf 10 mg Frischgewebe.

3, 4 und 5 Tage nach der Injektion des DOPA befindet sich in den Nebennieren die höchste C^{14} -Aktivität. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen autoradiographischer Untersuchungen von ROSELL, SEDVALL und ULLBERG (20) überein, die während der Durchführung meiner Experimente publiziert wurden. ROSELL und Mitarbeiter fanden auf der Autoradiographie von einer nach 4 Tagen getöteten Maus nur noch in der Nebenniere eine nennenswerte Aktivität.

In 2 weiteren Versuchen mit verbesserter Technik (lyophilisiertes Gewebe wird im Scintillator homogenisiert; siehe "methodischer Teil") fand ich folgende Aktivitätsverteilung:

Tabelle 5: Aktivitätsverteilung nach Injektion von C^{14} -DOPA

	5 Tage/5 μ C dpm	7 Tage/20 μ C dpm
Nebennierenmark	550/620	1620
Nebennierenrinde	80	-
Nebenniere	-	1190
Niere	130	390
Leber	90	380
Pankreas	120	30
Milz	-	90

Angaben beziehen sich auf 10 mg Frischgewebe.

Damit war erwiesen, daß das Nebennierenmark die unter den bestimmten Gewebsarten größte Aktivität aufweist. Auf Grund der vorliegenden chromatographischen und autoradiographischen Arbeit von ROSELL und Mitarbeitern (20)

kann mit großer Sicherheit gesagt werden, daß das Nebennierenmark nicht nur die höchste Aktivität im Gesamtorganismus hat, sondern daß diese C^{14} -Aktivität vorwiegend von DOPA und seinen Stoffwechselprodukten Noradrenalin und Adrenalin herrührt.

III. Nikotinbehandlung von Ratten zur Erzeugung einer funktionellen Hyperplasie des Nebennierenmarkes

Im folgenden werden die Ergebnisse der Catecholaminbestimmung aufgeführt. Mit ihnen sollte nachgewiesen werden, ob sich bei nikotinbehandelten Ratten funktionelle Hyperplasien gebildet hatten.

1. Bestimmung des Catecholamingehaltes im 24-Stundenharn

Nach 8-12wöchiger Behandlung ergaben sich aus 20 Bestimmungen von unbehandelten Tieren und aus 8 Bestimmungen von nikotinbehandelten Tieren die folgenden Werte:

Normale Tiere: $1,4 \pm 0,9 \mu\text{g}$ Noradrenalin und $3,3 \pm 1,3 \mu\text{g}$ Adrenalin; nikotinbehandelte Tiere: $1,3 \pm 0,6 \mu\text{g}$ Noradrenalin und $2,3 \pm 0,9 \mu\text{g}$ Adrenalin pro kg Körpergewicht. Statt der erwarteten Erhöhung der Adrenalin-ausscheidung bei den nikotinbehandelten Tieren zeigte sich eine leichte Verminderung der Ausscheidung, die bei den erheblichen Schwankungen der Werte jedoch nicht als gesichert gelten kann.

Diskussion zu Abschnitt III, 1

Da bei der Bestimmung der Catecholamine aus methodischen Gründen immer nur ein Zehntel des vorhandenen Eluates verwendet werden kann, bewegt sich die Methode hier an der Grenze ihrer Empfindlichkeit ($0,01 \mu\text{g}$). Deswegen ist es nicht erstaunlich, daß bei den Ergebnissen große Abweichungen (bis zu 50%) vorkommen. Bei Ausbeutebestimmungen stellte ich eine Reihe von Fehlerquellen fest, wie sie auch von anderen Autoren (21) beobachtet worden sind. Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß bei pH 6 Noradrenalin und Adrenalin zu dem betreffenden Fluorophor oxydiert werden, während bei pH 3,5 nur Adrenalin oxydiert wird. Bei dem Einsatz von Reinsubstanzen stellte ich fest, daß bei pH 3,5 die Oxydation von Adrenalin nicht vollständig war, so daß auch unter Berücksichtigung der verschiedenen Fluoreszenzintensität der beiden Catecholamine bei 365 m μ angenommen werden muß, daß etwa 70% Nor-

adrenalin zu viel und 35% Adrenalin zu wenig gefunden wurden. Der Zusatz von 2 µg Noradrenalin und 2 µg Adrenalin zu Rattenharn bewirkte eine Ausbeute an Noradrenalin zwischen 10 und 20% und 67 bis 100% Adrenalin. Aus wäßrigen Lösungen konnten weitaus bessere Ausbeuten gewonnen werden. Eine weitere Fehlerquelle stellt die Adsorption der Amine an Aluminiumoxyd und die nachfolgende Elution dar. Möglicherweise beeinflussen zahlreiche im Harn gelöste Stoffe die Adsorption der sehr kleinen Mengen von Noradrenalin und Adrenalin ungünstig; denn bei höheren Catecholaminkonzentrationen, wie sie z. B. im menschlichen Harn angetroffen werden, ist die Ausbeute bedeutend besser. Bei der Bestimmung der Catecholamine in der Nebenniere versuchte ich, die methodischen Fehlerquellen durch Anbringung entsprechender Korrekturfaktoren auszugleichen.

2. Bestimmung des Catecholamingehaltes des 24-Stundenurin nach Reserpininjektion

Nachdem mit der unter 1) beschriebenen Versuchsanordnung keine Erhöhung der Catecholaminausscheidung bei nikotinbehandelten Ratten gezeigt werden konnte, versuchte ich, die Adrenalinausschüttung mit Reserpininjektion zu provozieren. Auch dadurch konnte keine Mehrausscheidung von Catecholaminen nachgewiesen werden. Der Wert für die 1 Jahr mit Nikotin behandelten Ratten lag nur um 1,4% höher als der Vergleichswert von normalen Tieren. Abweichungen bis zu 10% entstehen jedoch schon allein durch Schwankungen des elektrischen Meßgerätes.

Dieser Versuch hatte nur orientierende Bedeutung.

3. Bestimmung des Catecholamingehaltes in den Nebennieren

Aus Tabelle 7 (Seite 25) ist zu ersehen, daß die Nebennieren eines 1 Jahr und 2 Monate mit Nikotin behandelten Tieres weder pro Nebenniere noch pro Gewichtseinheit Gewebe mehr Catecholamine enthalten als die Nebennieren von 2 unbehandelten Tieren. (Auch diese Untersuchungen trugen nur orientierenden Charakter.)

Wenn die Ergebnisse von den Nebennieren un behandelter Ratten in Gewicht pro Gewebsmenge angegeben werden, ergibt sich für 10 mg Nebennierengewebe ein Catecholamingehalt von 1,5 bis 2,4 µg Noradrenalin und 6,7 bis 11,2 µg Adrenalin. Mit pharmakologischen Methoden fanden DE SCHAEPPDRYVER und PREZIOSI (22) in Nebennieren von Mäusen einen Catecholamingehalt von $15,29 \pm 1,87$ µg Noradrenalin ($\hat{=}$ 1,5 µg/10 mg Gewebe) und $70,20 \pm 2,55$ µg ($\hat{=}$ 7,0 µg/10 mg Gewebe) Adrenalin pro 100 mg Gewebe.

Tabelle 7: Catecholamingehalt von Rattennebnieren

	Normaltier/295g		Normaltier/295g		Nikotintier/305g	
Nebennieren- gewicht (mg)	14,1	15,3	17,2	18,5	20,3	18,9
Noradrenalin	3,0	1,8	3,6	2,8	3,0	1,6
Adrenalin (µg)	9,4	11,6	16,6	20,8	12,8	8,0

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß kein Hinweis darauf gefunden wurde, daß bei Ratten infolge chronischer Nikotinvergiftung erhöht Catecholaminmengen gebildet und ausgeschieden werden. Entgegen den Erwartungen fand ich eine, wenn auch nicht gesicherte Verringerung des Catecholamingehaltes der Nebenniere und der Catecholaminausscheidung im Urin. Die Bestimmung des Catecholamingehaltes des 24-Stundenurins wurde immer für den Zeitraum vom 2. bis 3. Tag nach der letzten Nikotininjektion vorgenommen. Wahrscheinlich war der Catecholaminverlust, der nach jeder Nikotinverabreichung auftritt, zu dieser Zeit noch nicht ausgeglichen. Nach DE SCHAEPDRYVER und PREZIOSI (22) hätte erst nach einer Woche mit einer vollständigen Auffüllung der Catecholamindepots im Nebennierenmark gerechnet werden können. Bei der Bestimmung des Catecholamingehaltes der Nebennieren ließ ich zwischen letzter Nikotininjektion und Versuchsbeginn 8 Tage verstreichen. Aber auch dabei konnte kein vermehrter Catecholamingehalt festgestellt werden.

Die hier gefundenen Ergebnisse erlauben wegen der zahlreichen Fehlermöglichkeiten keine Aussage über das Vorliegen funktioneller Hyperplasien des Nebennierenmarkes bei nikotinbehandelten Ratten. Obwohl Aktivität und Lobelingehalt (Tabelle 2 und 3) des Nebennierenmarkes nikotinbehandelter Ratten höher sind als bei normalen Ratten kann nicht gesagt werden, daß das auf eine Hyperplasie des Nebennierenmarkes zurückzuführen ist.

E) Diskussion

I. Zur Methodik

Bei der Bestimmung der Tritiumaktivität wirkt sich die Teilchengröße des suspendierten radioaktiven Materials (Gewebe) auf die Gesamtausbeute aus. Sind die Teilchen zu groß, wird die β -Strahlung des eingeschlossenen Tritiums nicht mehr im Scintillator wirksam, weil sie von den Randschichten des Teilchens absorbiert wird. Selbst wenn das Gewebe im Scintillator homogenisiert wird, sind die Teilchen der Suspension immer noch so groß, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Teil des Tritiums bei der Messung nicht miterfaßt wird. Durch das Homogenisieren entstehen jedoch etwa gleichgroße Teilchen, so daß die Ausbeute bei allen Proben um das gleiche Maß vermindert ist. Damit war die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gesichert.

Bei der Suspension des Kieselgels (Trennschicht bei der Dünnschichtchromatographie) zur Aktivitätsbestimmung des Lobelin fand ich 22% der aufgetragenen Gesamtaktivität wieder. Wenn man berücksichtigt, daß mit dem Lösungsmittel, das zum Auftragen der Substanz verwendet wird, und dem Fließmittel, das nach Abschluß der Laufzeit verdampft, auch ein Teil der Aktivität durch ausgetauschtes Tritium verlorengeht, erscheint diese Ausbeute befriedigend. In diesem Fall befinden sich die radioaktiven Moleküle allerdings auch an der Oberfläche des suspendierten Teilchens adsorbiert, so daß nahezu alle Tritiumaktivität im Scintillator wirksam werden kann.

Eine weitere Schwierigkeit der Aktivitätsbestimmung von Tritium und C^{14} im Flüssigkeitscintillator liegt darin, zwischen den sich beeinflussenden Größen "Zahlausbeute" und "Impulsrate" das optimale Verhältnis zu finden.

Mit zunehmender Färbung (je nach Farbe des suspendierten Gewebes) und Impulszahl der Probe verschlechtert sich die Zahlausbeute der Probe. Bei steigender Impulszahl wird außerdem die Genauigkeit der Bestimmung der Zahlausbeute durch den sogenannten "quenching effect" zunehmend beeinträchtigt. Bei niedrigen Impulsraten und wenig gefärbten Proben wird eine bessere Zahlausbeute erzielt, und der quenching effect verliert an Bedeutung, aber die statistische Ungenauigkeit wird größer.

Unter Verwendung von 30 mg Frischgewebe oder 10 mg lyophilisiertem Gewebe zum Homogenisieren erzielte ich gute Zahlausbeuten. Die Impulsraten überstiegen jedoch nur bei stark radioaktiven Gewebeproben 1000 ipm. Bei der Bestimmung der Aktivität der Nebennieren war die Impulsrate von vornherein durch die vorhandene Gewebsmenge bestimmt. Da es jedoch nicht darauf an-

kam, feine Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Gewebsarten zu zeigen, sondern nur große Aktivitätsunterschiede, konnte eine begrenzte statistische Ungenauigkeit in Kauf genommen werden.

II. Lobelin

1. Verteilung der Tritiumaktivität im Organismus

Die Aktivitätsbestimmung der Organgewebe konnte nur orientierenden Charakter haben, weil der Wert ihrer Ergebnisse von vornherein durch die Labilität der Tritiummarkierung und durch die Verunreinigung des tritierten Lobelin stark beeinträchtigt wurde. Deshalb erscheint es nicht sinnvoll, diese Ergebnisse im einzelnen zu diskutieren, bevor nicht zu jedem Wert das entsprechende chromatographische Ergebnis vorliegt. Infolgedessen soll hier nur kurz darauf eingegangen werden: Besonders auffallend war die Tatsache, daß die Aktivität der meisten Organe bis 5 Minuten nach der Injektion anstieg, dann abfiel und nach 15 Minuten einen zweiten Gipfel erreichte. Es ist anzunehmen, daß diese Erscheinung entweder durch Austausch von Tritium (Wechsel des pH von ca. 5 der physiol. Kochsalzlösung auf 7,2 des Blutes) zustande gekommen ist oder durch eine Verunreinigung des tritierten Lobelin (siehe Abschnitt C, I, 4, Seite 8). Freiwerdendes Tritium oder eine niedermolekulare Substanz können rasch in die Gewebe diffundieren (5 Minutengipfel), während das große Lobelinmolekül nur langsam in die Gewebe eindringt. Diese Überlegung hat mich veranlaßt, Organe einer 15 Minuten nach der Injektion getöteten Ratte chromatographisch auf ihren Lobelingehalt zu untersuchen.

Weiterhin fällt auf, daß zahlreiche Organe nikotinbehandelter Ratten eine höhere Aktivität aufweisen als die normaler Tiere. Zunächst muß hier an methodische Ursachen gedacht werden. Es konnte beobachtet werden, daß die nikotinbehandelten Ratten gegenüber den Kontrolltieren Gewichtsverluste aufwiesen (23). Bei den relativ mageren nikotinbehandelten Ratten kann es zu einer Lobelinverteilung zu Gunsten der Organgewebe gekommen sein. Allenfalls auf Grund dieser Überlegungen war es fraglich, eine Erhöhung von Aktivität und Lobelingehalt des Nebennierenmarkes als Zeichen für eine funktionelle Hyperplasie zu werten.

2. Chromatographie der Gewebsextrakte

Erst die Chromatographie zeigte, daß sich das Lobelin tatsächlich vor allen

anderen Organen selektiv im Nebennierenmark anreichert. Trotzdem kann es für die Lokalisierung des Phäochromocytoms als nicht geeignet gelten, weil sich in den benachbarten Organen Lunge und Pankreas ebenfalls erhebliche Lobelinmengen befinden. Der Lobelingehalt der Lunge wird von dem des Nebennierenmarkes nur um 20 bis 75% übertroffen.

Dafür, daß Lobelin befähigt ist, wie das Nikotin Catecholamine aus dem Nebennierenmark freizusetzen, sprechen die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen:

BERTRAM (24) hatte 1928 beobachtet, daß die Hyperglykämie nach Lobelininjektion ausbleibt, wenn bei den Versuchstieren die Nebennieren entfernt worden waren. Auf Grund dieser Feststellung wurde angenommen, daß die Hyperglykämie nach Lobelininjektion auf eine Freisetzung von Catecholaminen aus den Nebennieren beruht. Nach Befunden von HILLAPP (25) sind die Catecholamine im Nebennierenmark an ATP gebunden gespeichert, und es wird vermutet, daß z. B. das stark basische Nikotin die Catecholamine aus ihrer Bindung an die sauren Gruppen der Polyphosphate verdrängt. Nach dem oben erwähnten Autor und nach Untersuchungen von SCHIEVELBEIN und WERLE (26), nach denen Lobelin befähigt ist, auch andere biogene Amine freizusetzen und auf Grund unserer Befunde kann die Ansicht bestätigt werden, daß Lobelin wie Nikotin sich an die Stelle der Catecholamine an Phosphatgruppen des ATP setzt.

Neben der hier interessierenden Problematik drängt sich die Frage auf, ob der hohe Lobelingehalt der Lunge in Zusammenhang mit der atemstimulierenden Wirkung des Lobelin steht. BEVAN (27) stellte durch Injektion von Lobelin in den rechten Vorhof fest, daß das Lobelin schon bevor es in den großen Kreislauf gelangt u. a. eine atemstimulierende Wirkung ausübt. Daraus schließt der Autor, daß das Lobelin an sensorischen Nervenendigungen im Gefäßsystem des Pulmonalkreislaufs wirksam wird. Möglicherweise steht diese von BEVAN gefundene Wirkung mit der selektiven Anreicherung des Lobelin in der Lunge in Beziehung.

III. DOPA

Da die Bedeutung des DOPA bei der Biosynthese des Adrenalin bekannt ist und außerdem von ROSELL und Mitarbeitern (20) die Ergebnisse autoradiographischer und chromatographischer Untersuchungen über das Schicksal des DOPA im Organismus vorliegen, beschränkte ich mich bei den Versuchen mit C^{14} -DOPA auf die Bestimmung der C^{14} -Aktivitätsverteilung.

Die innerhalb von 4 Tagen nach der Injektion von DOPA untersuchten Nebennieren zeigten eine konstante Aktivität (die Abweichungen liegen innerhalb der Fehlerbreite der Methode). Die zunächst hohe Aktivität von Niere und Leber sank innerhalb von 5 bis 7 Tagen so stark ab, daß sie schließlich von der Aktivität des Nebennierenmarkes um 320 bis 390% übertroffen wurde. Bei längerer Versuchsdauer hätte sich vielleicht sogar eine noch günstigere Relation erreichen lassen.

Es wurde hier auch der Nachweis erbracht, daß die Nebennierenrinde nur eine unbedeutende Aktivität erreicht. Sicher wird das C^{14} -DOPA in die Biosynthese des Adrenalin einbezogen, so daß die C^{14} -Aktivität weniger vom DOPA herührt, sondern vor allem von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Für diese Ansicht sprechen die Ergebnisse von ROSELL und Mitarbeitern (20), die nach C^{14} -DOPA-Injektion radioaktives Noradrenalin aus Organgeweben chromatographierten.

Aus all dem läßt sich folgern, daß DOPA hinsichtlich seiner Affinität zum sympathischen Gewebe des Nebennierenmarkes für die Lokalisationsdiagnose des Phäochromocytoms (Ph) geeignet ist. Die Voraussetzung der Kennzeichnung sympathischen Gewebes mit radioaktiv markiertem DOPA besteht jedoch darin, daß die biochemischen Eigenschaften des Moleküls nicht durch das eingebaute Isotop verändert werden. Für die Lokalisationsdiagnose des Ph ist aber, wie eingangs erläutert, ein Isotop mit energiereicher Strahlung (wie z. B. das J^{131}) notwendig. Das bedeutet, daß die Isotope von Wasserstoff und Kohlenstoff nicht verwendbar sind. Ein dem Molekül fremdes Atom stabil einzubauen, könnte zu Veränderungen des biochemischen Verhaltens führen. Aufzuklären, ob das DOPA diese und die anderen eingangs (Seite 2) erwähnten Bedingungen erfüllt, um für die Diagnose des Ph geeignet zu sein, bleibt weiteren Untersuchungen überlassen.

Schließlich kann auch an die Möglichkeit gedacht werden, ein markiertes DOPA zur Therapie des Ph zu verwenden. Hierfür sind jedoch Untersuchungen über die gewebsschädigende Wirkung eines solchen DOPA auf das Nebennierenmark und auf andere Organe des Organismus erforderlich.

F) Zusammenfassung

Das Vorliegen eines Phäochromocytoms (Ph) laßt sich durch klinisch-chemische Untersuchungen mit ausreichender Genauigkeit beweisen, dagegen stoßt die Lokalisation des Tumors sehr oft auf erhebliche Schwierigkeiten. Bessere diagnostische Möglichkeiten können durch die Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen erwartet werden. Unter den verschiedenen Bedingungen, die eine zur Diagnose und Lokalisation des Ph geeignete Substanz erfüllen muß, ist an erster Stelle die Fähigkeit zur selektiven Anreicherung im Tumorgewebe zu nennen. Es wurde erwartet, daß diese Bedingung von Liberatoren und Vorstufen der Catecholamine erfüllt wird und es wurden daher mit Tritium markiertes Lobelin und C^{14} -Dihydroxyphenylalanin (DOPA) eingesetzt. Es werden die im folgenden erwähnten Untersuchungen durchgeführt und die nachstehend aufgeführten Ergebnisse erzielt:

Die Bestimmung der Aktivität und der Reinheit des tritierten Lobelin sowie der Nachweis und die quantitativen Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität des H^3 -Lobelin und des C^{14} -DOPA werden im methodischen Teil eingehend dargestellt. Dünnschichtchromatographische, photometrische und andere Methoden zur Identifizierung und Bestimmung der beiden Substanzen wurden verwendet.

Zur Erzeugung einer funktionellen Hyperplasie des Nebennierenmarkes ("experimentelles Phäochromocytom") wurde weiblichen Ratten ein Jahr lang Nikotin subcutan injiziert. Dieses Vorgehen sollte zur Unterscheidung von normalem und pathologisch vermehrten Nebennierenmarkgewebe dienen.

Die Bestimmung der Ausscheidung von Catecholaminen und deren Metaboliten im Harn sowie die Bestimmung der Catecholamine im Nebennierenmark der mit Nikotin behandelten Ratten lieferte jedoch keinen Hinweis auf das Vorliegen einer funktionellen Hyperplasie.

H^3 -Lobelin und C^{14} -DOPA reichern sich bei intravenöser Injektion selektiv im Nebennierenmark an. H^3 -Lobelin wird aber auch in erheblicher Konzentration in Lunge und Pankreas gefunden. Es kann daher als nicht geeignet für die Diagnose des Ph angesehen werden.

Dagegen hatte 5 - 7 Tage nach der Injektion von C^{14} -DOPA das Nebennierenmark eine Radioaktivität, die die anderer Organe um ca. 350% übersteigt.

Die Messung der Aktivität des Nebennierenmarkes von mit Nikotin behandelten Ratten nach intravenöser Injektion von H^3 -Lobelin und C^{14} -DOPA ergab

keinen Hinweis auf das Vorliegen einer funktionellen Hyperplasie des Nebennierenmarkes.

In der Diskussion wird auf die Methodik, die Verteilung von H^3 -Lobelin und C^{14} -DOPA im Organismus eingegangen und die besondere Eignung des radioaktiv markierten DOPA zur Diagnose des Ph begründet.

Literaturverzeichnis

1. BAUER, K.H.: "Das Krebsproblem", Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963, S. 188.
2. SHIMAMOTO, T., YAMAZAKI, H., TSUCHIHASHI, H. and ISHIOKA, T.: "MAO inhibitor nialamide, a new type of anti-thrombotic substance in vascular, especially cardiovascular disorder", Asian Med. J. 4, 5 (1961).
3. SACK, H. und KOLL, J.F.: "Das Phäochromocytom", Ergebnisse der inneren Medizin und Kinderheilkunde 19, 446 (1963).
4. LARSON, P.S., HAAG, H.B. and SILVETTE, H.: "Tobacco", Baltimore, 1961, S. 354.
5. HANSSON, E. and SCHMITTERLÖW, C.G.: "Physiological disposition and fate of C¹⁴-labelled nicotine in mice and rats", J. Pharm. exp. Therap. 137, 1 (1962).
6. GRAUBNER, W. und PETERS, G.: "Lobelin und Lobeliaalkaloide", Handbuch der experimentellen Pharmakologie 1, 1955, Berlin.
7. SCHIEVELBEIN, H.: "Effects of nicotine on storage and release of biogenic amines", Third World Tobacco scientific Congress, Salisbury, South Rhodesia, 18.-26.2.1963.
8. STAEMMLER, M.: "Die chronische Vergiftung mit Nikotin. Ergebnisse experimenteller Untersuchungen an Ratten", Virchows Arch. 259, 366 (1935).
9. STAEMMLER, M.: "Über die geschwulstartigen Bildungen im Nebennierenmark als Folge experimenteller Nikotinvergiftungen", Klin. Wschr. 14, 404 (1936).
10. LUPULESCU, A.: "Les phéochromocytomes experimentaux", Ann. Endocrinologie 22, 459 (1961).
11. MEDZIHRADESKY, F.: "Dissertation", organisch-chemisches Institut der TH München, 1964.
12. GETOFF, N.: "Kurzes radiochemisches Praktikum", Wien 1961, S. 39 ff.

13. BELL, C.G. and HAYES, F.N.: "Liquid scintillation countings",
Pergamon Press, New York-London-Paris, 1958.
14. WHITE, C.G. and HELF, S.: "Suspension counting in scintillating gels",
Nucleolics 14, 46 (1956)
15. WILZBACH, K.E.: "Tritium labelling by exposure organic compounds
to tritium gas",
J. Amer. chem. Soc. 79, 1013 (1957).
16. STAHL, E.: "Dünnschichtchromatographie",
Berlin 1962, S. 287.
17. v. EULER, U.S. and FLODING, E.: "Diagnosis of pheochromocytoma by
fluorimetric estimation of adrenalin and nor-
adrenalin in urine",
Scand. J. clin. Lab. Invest. 8, 288 (1956).
18. BICKEL, M.H., CARPI, A. and BOVET, D.: "Action reserpin and
monoamine oxidase inhibitors on the urinary
excretion of catecholamines in the rat",
Helv. Physiol. Acta 19, 279 (1961).
19. KUNTZMANN, R., SHORE, P.A., BOGDANSKI, D. and BRODIE, B.:
"Microanalytical procedures for fluorometric
assay of brain DCPA-5-HTP decarboxylase,
norepinephrine and serotonin, and a detailed
mapping of decarboxylase activity in brain",
J. Neurochem. 6, 226 (1960).
20. ROSELL, S., SEDVALL, G. and ULLBERG, S.: "Distribution and fate of
dihydroxyphenylalanine-2-C¹⁴ (DCPA) in mice",
Biochem. Pharmacol. 12, 265.
21. RITZEL, G.: "Über die Bestimmung von Catecholaminen im Urin",
Klin. Wschr. 41, 419 (1963).
22. De SCHAEPPDRYVER, A.F. and PREZICSI, P.: "Pharmacological depletion
of adrenaline and noradrenaline in various organs
of mice",
Arch. int. pharmacodyn. 121, 177 (1959).
23. SCHIEVELBEIN, H.: "Biochemische Ursachen für die Gewichtszunahme
nach Nikotinentzug",
Fortschritte der Medizin 10, 421 (1963).

24. BERTRAM, F.: "Zur Pharmakologie des Lobelin",
Arch. exp. Path. Pharm. 128, 179 (1928).
25. HILLARP, N.A.: "Further observations on the state of the
catecholamines stored in the adrenal medullary
granules",
Acta physiol. scand. 47, 271 (1959).
26. SCHIEVELBEIN, H. und WERLE, E.: "Über die Freisetzung von Serotonin
durch Lobelin",
Dtsch. med. Wschr. 2023 (1962).
27. BEVAN, J.A.: "Action of Lobeline and capsaicine on afferent
endings in the pulmonary of the cat",
Circulation Res. 10, 792 (1962).

Für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Professor Dr. Dr. Werle.

Herrn Priv.-Dozent Dr. Schievelbein bin ich für die Hilfe während meiner Arbeit zu Dank verpflichtet. Herrn Professor Dr. Lamprecht und Herrn Dipl.Chem. Medzihradsky danke ich für die Ermöglichung der Messungen und für die Tri-
tierung des Lobelin.

Allen Mitarbeitern des Klinisch-Chemischen und des Organisch-Chemischen Institutes, insbesondere Herrn Dipl.Chem. Rauschenbach, danke ich für ihre Unterstützung.

L e b e n s l a u f

Am 18.8.1939 wurde ich, Richard Johannes Konrad Falke in Gröna (Sachsen) als einziges Kind des Pfarrers Johannes Falke und seiner Frau Ilse, geb. Ahrberg, geboren. 1944 fiel mein Vater an der Ostfront. Von 1945 bis 1953 besuchte ich in Gröna die Grundschule und danach bis 1957 in Chemnitz die Oberschule. Meine Mutter heiratete 1955 den praktischen Arzt Dr. Heinz Burckhardt in Chemnitz.

Nach dem Abitur absolvierte ich in Marburg einen "Ergänzungskurs für Abiturienten aus Mitteldeutschland" und begann im Sommersemester 1958 mit dem Medizinstudium.

Seit November 1964 arbeite ich als Medizinalassistent.



